



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/49, C07K 14/155, 16/10, A61K 39/21, C12Q 1/68, G01N 33/569		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/00784
			(43) Date de publication internationale: 11 janvier 1996 (11.01.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00848 (22) Date de dépôt international: 26 juin 1995 (26.06.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/07933 28 juin 1994 (28.06.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BERTONI, Giuseppe [CH/CH]; Kappelacker 13, CH-3182 Oberstorf (CH). PAN-CINO, Gianfranco [IT/FR]; 14, quai de la Marne, F-75019 Paris (FR). PETERHANS, Ernst [CH/CH]; Wyderrain 7, CH-3012 Berne (CH). SONIGO, Pierre [FR/FR]; 23, rue Gutenberg, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: NUCLEIC ACID FRAGMENTS AND CORRESPONDING PEPTIDE FRAGMENTS FROM THE CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) GENOME, AND USES THEREOF (54) Titre: FRAGMENTS D'ACIDE NUCLEIQUE ET FRAGMENTS PEPTIDIQUES CORRESPONDANTS ISSUS DU GENOME DU VIRUS DE L'ARTHRITE ET DE L'ENCEPHALITE CAPRINE (VAEC) ET LEURS APPLICATIONS (57) Abstract <p>Nucleotide fragments from caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) <i>env</i> gene, corresponding peptide fragments, and uses thereof in screening for viral caprine arthritis-encephalitis, are disclosed. Antibodies to peptide fragments and uses thereof for diagnosing viral arthritis-encephalitis are also disclosed. Said nucleic acid fragments code for a peptide fragment including at least one CAEV Env protein segment comprising at least one immunodominant epitope selected from the transmembrane region of said protein, and include 15-255 nucleotides.</p> (57) Abrégé <p>Fragments nucléotides issus du gène <i>env</i> du virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine (VAEC ou CAEV : <i>caprine arthritis-encephalitis virus</i>) et fragments peptidiques correspondants et leurs applications au dépistage de l'encéphalite et de l'arthrite virale caprine. Anticorps anti-fragments peptidiques ainsi que leurs applications au diagnostic de l'encéphalite et de l'arthrite virale. Lesdits fragments d'acide nucléique codent pour un fragment peptidique incluant au moins un segment de protéine Env du VAEC comprenant au moins un épitope immunodominant, sélectionné dans la région transmembranaire de ladite protéine, lesquels fragments d'acide nucléique comprennent entre 15 et 255 nucléotides.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**FRAGMENTS D'ACIDE NUCLEIQUE ET FRAGMENTS PEPTIDIQUES
CORRESPONDANTS ISSUS DU GENOME DU VIRUS DE L'ARTHRITE ET
DE L'ENCEPHALITE CAPRINE (VAEC) ET LEURS APPLICATIONS.**

La présente invention est relative à des frag-
5 ments nucléotidiques issus du gène *env* du virus de
l'arthrite et de l'encéphalite caprine (VAEC ou CAEV :
caprine arthritis-encephalitis virus) et aux fragments
peptidiques correspondants et à leurs applications au
dépistage de l'encéphalite et de l'arthrite virale
10 caprine ; la présente invention est également relative à
des anticorps anti-fragments peptidiques ainsi qu'à leurs
applications au diagnostic de l'encéphalite et de
l'arthrite virale.

Le virus de l'arthrite et de l'encéphalite
15 caprine est un lentivirus, entraînant une leucoencépha-
lite chez les jeunes chèvres et une arthrite chronique
clinique, chez 20 à 30 % des chèvres adultes infectées
naturellement. L'arthrite est habituellement progressive
et est particulièrement sévère au niveau des espaces
20 synoviaux des articulations carpiennes.

La séquence nucléotidique de la souche VAEC-CO
a été séquencée et décrite (M. SALTARELLI et al., *Virol.*,
1990, 179, 347-364), à partir de clones infectieux, obte-
nus à partir de fragments *HindIII*, transfectés dans des
25 cellules de membrane synoviale de chèvre. Le génome com-
prend 9189 nucléotides et inclut successivement la
séquence codant pour le LTR, les séquences codant pour
les différentes protéines virales : protéine Gag, pro-
téine Pol, la protéine de régulation Q, la protéine Tat,
30 les protéines d'enveloppe et la protéine Rev.

L'organisation du gène *env*, codant pour la
glycoprotéine d'enveloppe du VAEC est similaire à celle
des virus du mouton (virus VISNA) et comprend une
séquence codant pour une protéine de surface (SU) et une
35 séquence codant pour une protéine transmembranaire (TM),
qui forment la glycoprotéine d'enveloppe.

Les protéines d'enveloppe du VAEC sont considérées comme étant au centre de la relation hôte-virus ; leur étude est donc essentielle pour comprendre l'interaction du virus avec le système immunitaire (épitopes neutralisants, épitopes B et T) et avec les cellules-cibles de l'infection et pour mettre au point des réactifs de diagnostic performants.

La sévérité de la maladie chez les animaux infectés semble directement corrélée au taux d'anticorps anti-protéine d'enveloppe virale (Env), et en particulier au taux d'anticorps anti-protéine transmembranaire (TM) et/ou au taux d'anticorps anti-protéine de surface (SU) de ladite protéine d'enveloppe Env (T.C. McGUIRE et al. J. Virol., 1992, 66, 5, 3247-3250 ; D.P. KNOWLES et al., 1991, J. Virol., 1991, 65, 11, 5744-5750).

En effet, la réponse immune à l'antigène viral joue un rôle important dans l'inflammation des articulations (en particulier, l'inflammation des espaces synoviaux des articulations carpiennes), notamment en raison d'une infiltration massive desdites articulations par des lymphocytes, plasmocytes et macrophages et par une accumulation d'anticorps dirigés contre la protéine Env.

En particulier, les sérums, présentant un titre important vis-à-vis des glycoprotéines TM monomérique (38 kDa) et oligomérique, se retrouvent chez les chèvres présentant une arthrite progressive (D.P. KNOWLES et al., J. Virol., 1990, 64, 2396-2398).

En outre, les chèvres, vaccinées avec du virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine inactivé, développent une arthrite plus sévère, après infection en laboratoire, que les animaux contrôles (McGUIRE et al., J. Vet. Res., 1986, 47, 537-540).

Il est donc crucial d'établir une surveillance constante des troupeaux, afin d'éviter la propagation de la maladie, en particulier en excluant le plus rapidement possible les animaux malades.

A l'heure actuelle, l'arthrite à VAEC est essentiellement diagnostiquée à l'aide de tests sérologiques, basés sur une préparation de virus entier ; de tels tests présentent l'inconvénient d'être difficiles à
5 préparer et d'être coûteux ; ils nécessitent également une mise au point particulièrement délicate (problème de standardisation) et peuvent, en outre, entraîner des réactions faussement négatives et/ou des réactions faussement positives.

10 Il existe également d'autres tests (tests ELISA), utilisant des protéines recombinantes Gag ; de tels tests présentent également l'inconvénient d'entraîner des réactions faussement négatives et/ou faussement positives et créent, en outre, des problèmes
15 de bruit de fond.

Or, il est absolument crucial de disposer d'un test fiable et peu coûteux, de manière à pouvoir tester l'ensemble des troupeaux, pour éviter une contagion massive (notamment par le lait) (programme d'éradication).

20 La présente invention s'est, en conséquence, donné pour but de pourvoir à des réactifs aptes à dépister l'arthrite à VAEC, qui répondent mieux aux besoins de la pratique, notamment en permettant la mise au point de tests diagnostics hautement spécifiques (absence de faux-positifs et de faux négatifs) ne comportant en outre au-
25 cun risque pour l'utilisateur et permettant un dépistage rapide de l'ensemble des troupeaux.

La présente invention a pour objet des fragments d'acide nucléique, caractérisés en ce qu'ils codent
30 pour un fragment peptidique incluant au moins un segment de protéine Env du VAEC comprenant au moins un épitope immunodominant et sélectionné dans la région transmembranaire de ladite protéine, lesquels fragments d'acide nucléique comprennent entre 15 et 255 nucléotides.

35 Parmi ces fragments d'acide nucléique, on peut citer :

- un fragment, correspondant aux positions 8003-8163 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence TAAGGCAGCTGTCCAGACCCTTGCTAATGCAACTGCTGCACAGCAGGA TGTGT TAGAGGCAACCTATGCCATGGTACAGCATGTGGCTAAAGGCGTACGAATCTT
5 GGAAGCTCGAGTGGCTCGAGTGGAAAGCTATCACAGATAGAATAATGCTATACCAAG (SEQ ID n°1), et codant pour un fragment peptidique dénommé G1 ;
- un fragment, correspondant aux positions 8019-8264 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, et
10 codant pour un fragment peptidique dénommé G2 ;
- un fragment, correspondant aux positions 7991-8107 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, et codant pour un fragment peptidique dénommé G3 ;
- un fragment, correspondant aux positions
15 8204-8360 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence TACAAAAACAGAAGTAGCAAAATATATCAATTGGACGAGGTTTAAGGA TAATTGCACATGGCAGCAGTGGGAGAGAGGATTACAGGGGTATGATACAACTTAAC AATACTGTTAAAGGAATCAGCAGCAATGACACAAC TAGCAGAAGAGCAAGCA (SEQ ID n°2), et codant pour un fragment peptidique dénommé
20 G4 ;
- un fragment, correspondant aux positions 8090-8259 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence TAAAGGCGTACGAATCTTGGAAGCTCGAGTGGCTCGAGTGGAAAGCTAT CACAGATAGAATAATGCTATACCAAGAATTGGATTGTTGGCACTATCATCAATACTG
25 TATAACCTCTACAAAAACAGAAGTAGCAAAATATATCAATTGGACGAGGTTTAAGGA TAATTGCA (SEQ ID n°3), et codant pour un fragment peptidique dénommé G5 ;
- un fragment, correspondant aux positions 8049-8093 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de
30 séquence GATGTGT TAGAGGCAACCTATGCCATGGTACAGCATGTGGCTAAA (SEQ ID n°4), et codant pour un fragment peptidique dénommé TM1 ;
- un fragment, correspondant aux positions 8130-8165 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de
35 séquence GAAGCTATCACAGATAGAATAATGCTATACCAAGAA (SEQ ID n°5) et codant pour un fragment peptidique dénommé TM2 ;

- un fragment, correspondant aux positions 8160-8204 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence CAAGAATTGGATTGTTGGCACTATCATCAATACTGTATAACCTCT (SEQ ID n°6) et codant pour un fragment peptidique
5 dénommé TM3 ; et

- un fragment, correspondant aux positions 8256-8297 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence TGCACATGGCAGCAGTGGGAGAGAGGATTACAGGGGTATGAT (SEQ ID n°7) et codant pour un fragment peptidique dénommé
10 TM4.

La présente invention a également pour objet un fragment peptidique, caractérisé en ce qu'il inclut au moins un segment de protéine Env du VAEC, sélectionné dans la région transmembranaire de ladite protéine, com-
15 prenant entre 5 et 85 aminoacides et au moins un épitope immunodominant, et en ce qu'il est reconnu par au moins 60 % d'anticorps produits lors d'une infection et/ou lors d'une inoculation par une souche du VAEC.

On entend par épitope, au sens de la présente
20 invention, les épitopes spécifiques de groupe, c'est-à-dire communs à toutes les souches du VAEC (zones conservées), reconnus par les anticorps dirigés contre toutes les souches de VAEC (reconnaissance de groupe).

Parmi ces fragments peptidiques, l'invention
25 englobe entre autre :

- un fragment incluant un segment de 53 aminoacides, dénommé G1, et qui correspond aux positions 665-717 de la protéine Env du VAEC ;

- un fragment incluant un segment de 82
30 aminoacides, dénommé G2, et qui correspond aux positions 670-751 de ladite protéine Env ;

- un fragment incluant un segment de 38 aminoacides, dénommé G3, et qui correspond aux positions 661-698 de ladite protéine Env ;

- un fragment incluant un segment de 52 ami-
35 noacides, dénommé G4, et qui correspond aux positions 732-783 de la protéine Env ;

- un fragment incluant un segment de 56 aminoacides, dénommé G5, et qui correspond aux positions 694-749 de ladite protéine Env ;
- un fragment incluant un segment de 15 aminoacides, dénommé TM1, et qui correspond aux positions 680-694 de la séquence de la protéine Env du VAEC et dont la formule est :
Asp-Val-Leu-Glu-Ala-Thr-Tyr-Ala-Met-Val-Gln-His-Val-Ala-Lys (SEQ ID n°8) ;
- 10 - un fragment incluant un segment de 12 aminoacides, dénommé TM2, et qui correspond aux positions 707-718 de la séquence de la protéine Env du VAEC et dont la formule est :
Glu-Ala-Ile-Thr-Asp-Arg-Ile-Met-Leu-Tyr-Gln-Glu (SEQ ID
15 n°9) ;
- un fragment incluant un segment de 15 aminoacides, dénommé TM3, et qui correspond aux positions 717-731 de ladite protéine Env, lequel segment présente la séquence :
20 Xaa-Glu-Leu-Asp-Cys-Trp-His-Tyr-Xaa-Xaa-Tyr-Cys-Xaa-Thr-Ser (SEQ ID n°10),
dans laquelle l'acide aminé Xaa en position 1, 9 et 10 représente His ou Gln, l'acide aminé Xaa en position 13 représente Ile ou Val ; de préférence, lorsque
25 l'acide aminé Xaa en position 9 représente His, l'acide aminé Xaa en position 10 et l'acide aminé Xaa en position 1 représentent Gln et l'acide aminé Xaa en position 13 représente Ile et lorsque l'acide aminé Xaa en position 9 représente Gln, l'acide aminé Xaa en position
30 10 et l'acide aminé Xaa en position 1 représentent His et l'acide aminé Xaa en position 13 représente Val ;
- un fragment incluant un segment de 14 aminoacides, dénommé TM4, et qui correspond aux positions 749-762 de ladite protéine Env, lequel segment présente
35 la séquence :
Cys-Thr-Trp-Gln-Gln-Trp-Glu-Arg-Glu-Leu-Gln-Gly-Tyr-Asp (SEQ ID n°11).

De manière inattendue, l'ensemble des séquences définies ci-dessus permettent un dépistage spécifique et sensible d'une infection à VAEC.

Egalement de manière inattendue, parmi ces
5 fragments, les fragments peptidiques G5 ou TM3 et G4 ou TM4 présentent une corrélation significativement élevée avec le développement de la maladie et servent donc de marqueurs particulièrement spécifiques pour le diagnostic de l'infection au VAEC ; les fragments peptidiques G5 ou
10 TM3 servent également de marqueurs pour le diagnostic de l'infection à VISNA.

Au sens de la présente invention, le terme fragment peptidique, comprend tous les fragments incluant un segment de peptides tel que défini ci-dessus, ainsi
15 que les peptides homologues ; de manière générale, on entend par peptides homologues, les fragments peptidiques dont la position et la fonction sont équivalentes, au sein du VAEC (même localisation que celle définie ci-dessus, sur le génome du VAEC).

20 L'ensemble desdits peptides peut avantageusement être obtenu soit par clonage, soit par synthèse, notamment par synthèse de Merrifield.

La présente invention a également pour objet des anticorps anti-VAEC, caractérisés en ce qu'ils sont
25 constitués par des anticorps spécifiques d'au moins un fragment peptidique issu de la zone transmembranaire de la protéine Env de VAEC, conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet un procédé de dépistage d'une infection à VAEC et/ou à
30 VISNA, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter les anticorps, éventuellement présents dans un échantillon biologique, à l'aide d'au moins un peptide ou fragment de peptides conforme à l'invention, éventuellement fixé sur un support solide approprié, en mettant en présence ledit
35 échantillon biologique avec ledit/lesdits peptide(s) ou fragment(s) de peptides, auxquels se lient les anticorps, si de tels anticorps sont présents dans l'échantillon à

analyser, la lecture du résultat étant révélée par un moyen approprié, notamment EIA, RIA, fluorescence.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du dit procédé, le peptide est choisi parmi TM3 et TM4 ou un
5 mélange de ceux-ci.

La présente invention a, également, pour objet un procédé de dépistage d'une infection à VAEC, caractérisé en ce qu'un échantillon biologique convenablement traité pour extraire l'ADN et/ou les produits de trans-
10 cription du VAEC :

(1) est mis en contact avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini ci-dessus,

(2) après quoi, l'hybride formé est détecté.

De manière avantageuse, préalablement à
15 l'étape (1), ledit ADN peut être amplifié.

La présente invention a également pour objet un procédé de dépistage d'une infection à VAEC, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter les glycoprotéines d'enveloppe du VAEC, en mettant en présence un échantil-
20 lon biologique à tester avec au moins un anticorps anti-peptide conforme à l'invention, la lecture du résultat étant révélée par un moyen approprié.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui
25 ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de
30 l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Peptides conformes à l'invention.

1) Construction d'une banque d'expression des peptides conformes à l'invention :

a) Clonage du gène env :

5 Le gène env est obtenu à partir d'un clone infectieux du VAEC-CO (M. SALTARELLI et al., Virology, 1990, **179**, 347-364).

10 Les positions nucléotidiques et aminoacides, qui définissent les différentes régions env précitées, correspondent aux positions des séquences telles que publiées dans cette référence.

15 Le clone du VAEC-CO consiste en deux plasmides, l'un contenant une grande partie du génome du VAEC-CO à partir du 5'-LTR et le deuxième contenant un insert court de 321 pb, comprenant les séquences codant pour la partie C-terminale de Env et la partie 3' du LTR viral.

20 Pour générer un plasmide contenant la région codant pour la protéine Env entière, le fragment SmaI-HindIII du VAEC-CO est sous-cloné dans le plasmide pUC18, ainsi que le fragment HindIII-HindIII de 321 pb ; on obtient une construction dénommée pUC18 env 3.1. (figure 1).

25 b) Construction de la banque d'expression λ gt11 :

30 Le plasmide pUC18 env 3.1 est soumis à une digestion partielle à l'ADNase I à 15°C (15 pg/ml d'ADNase I dans du Tris-HCl, pH 7,4 en présence de MgCl₂, 1,5 mM, pendant 20 min), de manière à obtenir différents fragments d'ADN, d'environ 200 pb.

Ces différents fragments sont traités avec le fragment de Klenow de l'ADNase polymérase d'E. coli, de manière à obtenir des extrémités à bouts francs, pour une ligature efficace avec des séquences de liaison EcoRI de 35 10 paires de base (pb) (Pharmacia).

Le marquage au phosphore 32 des fragments d'ADN permet le contrôle des étapes ultérieures.

Les produits de la ligature sont alors digérés avec l'enzyme de restriction EcoRI et séparés par électrophorèse dans des gels d'agarose LMP NUSieve® 2 %, de manière à sélectionner un ensemble de fragments comprenant entre 100 et 200 pb et à éliminer les séquences de liaison libres.

Les fragments sélectionnés sont extraits au phénol à partir de l'agarose ; on insère ensuite les différents fragments obtenus dans le site EcoRI du phage λ gt11.

Les produits de la ligature (phages recombinants) sont alors empaquetés *in vitro*. Une banque de $3 \cdot 10^6$ phages est ainsi constituée.

On obtient ainsi une banque d'expression de peptides Env de VAEC, fusionnés à la β -galactosidase, et exprimés dans *E. coli*, en utilisant le vecteur λ gt11.

Un échantillon de la banque λ gt11 est inoculé sur la souche de *E. coli* Y1090 à une dilution représentant 10^4 phages par boîte de 90 cm de diamètre.

L'induction de l'expression de la protéine sous contrôle du promoteur Lac est déclenchée à 42°C, en présence d'isopropyl-thio- β -galactosidase (IPTG). Les phages recombinants sont sélectionnés par l'absence de coloration bleue des plaques de lyse.

c) Contrôle des peptides obtenus :

Les phages λ gt11 recombinants permettent l'expression des fragments de gènes env sous le contrôle du promoteur Lac, après fusion de l'ADN env avec le gène de la β -galactosidase de *E. coli*.

Pour contrôler la qualité de ladite banque, et également obtenir un titre plus important, 40 plaques ont été isolées et analysées par PCR, en utilisant des

amorces λ gt11 complémentaires, spécifiques de la portion β -galactosidase de la matrice λ gt11 comme suit :

un total de 10 μ l de lysat de phage est dilué dans 60 μ l d'eau et porté à ébullition pendant 10 min.

- 5 Après microcentrifugation, 15 μ l du surnageant sont ajoutés à 85 μ l d'un mélange PCR contenant 50 pM de chaque amorce, 10 nM de chaque désoxynucléoside triphosphate et 0,5 U de Taq polymérase (Perkin-Elmer-Cetus), dans une solution de Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM et $MgCl_2$ 2 mM.

- 10 Les amorces λ gt11 utilisées sont, comme précisé ci-dessus, complémentaires de la portion β -galactosidase de la matrice λ gt11, à savoir :

5'GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCCG 3' (amorce sens)
(SEQ ID N° 12)

- 15 5'TTGACACCAGACCAACTGGTAATG 3' (amorce anti-sens) (SEQ ID N° 13).

La PCR comprend 32 cycles (cycle 1 : 94°C, 2 min ; cycles 2 à 31 : 94°C, 15 sec./55°C, 30 sec./72°C, 30 sec. ; cycle 32 : 72°C, 3 min).

- 20 Les produits de l'amplification montrent que l'on obtient des inserts de différentes tailles, comprenant entre 130 et 250 pb.

- Ces fragments amplifiés par PCR sont ensuite hybridés avec trois fragments NcoI radioactifs marqués au phosphore 32, représentant la séquence Env de VAEC-CO
25 entière (sonde 1 : 6071-6456, sonde 2 : 6457-8071, sonde 3 : 8072-8712), indiquant que la banque est représentative du gène env entier.

2) Criblage de la banque :

- 30 La banque env λ gt11 est criblée en utilisant les sérums de 3 chèvres, naturellement infectées, et ayant un titre élevé en protéines Gag de VAEC, par test ELISA.

La sonde *E. coli* Y1090 est infectée par 3×10^4 PFU de la banque originale non amplifiée, étalée sur plaques et incubée à 42°C pendant 4 heures.

Les plaques sont alors recouvertes de filtres
5 de nitrocellulose, saturés avec de l'IPTG 10 mM et incubées pendant 3 heures à 37°C, de manière à induire l'expression de la protéine de fusion, β -galactosidase-peptide Env.

Les filtres sont traités pour un criblage immunologique avec des sérums de 3 chèvres par incubation
10 séparée (2 filtres par sérum), en utilisant des méthodes standard, telle que la procédure au lait dégraissé (MANIATIS).

Ce criblage permet d'isoler 5 clones fortement
15 immunoréactifs, qui sont séquencés selon le protocole suivant :

les produits de la PCR sont séparés sur gel d'agarose à 1,8 % et purifiés à l'aide de billes QIAEX® (Qiagen®), selon les instructions du fabricant.

20 Un total de 1 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) et de 20 pM soit d'amorce sens, soit d'amorce anti-sens, sont ajoutés dans un volume final de 10 μ l.

Ce mélange est dénaturé à 100°C, pendant 12 min, et immédiatement transféré dans un bain glacé de
25 méthanol.

1 μ l de dithiothréitol (0,1 M), 0,2 μ l dGTP (UBS), 0,5 μ l de [35 S]ATP (600 Ci/mM), 0,6 μ l de DMSO, 3,8 μ l de dH₂O et 0,2 μ l de Séquénase (UBS) sont ajoutés.

Les échantillons sont incubés à température
30 ambiante pendant 1 min, puis pendant 15 min à 37°C.

Les séquences de ces 5 inserts, à savoir :

Nom du fragment	Positions sur la séquence d'acide nucléique	positions sur la protéine Env
G1	8003-8163	665-617
G2	8019-8264	670-751
G3	7991-8107	661-698
G4	8204-8360	732-783
G5	8090-8259	694-749

sont comprises dans la région extracellulaire de TM.

Ces résultats indiquent l'immunodominance et la conservation de ces domaines entre les différents isolats viraux.

3) Carte des épitopes immunodominants TM conformes à l'invention :

a) Protocole :

Une analyse Pepscan[®] est réalisée de manière à définir précisément les épitopes TM immunoréactifs.

Des décapeptides chevauchants couvrant les séquences comprises entre les positions 8022 et 8327 de la protéine Env du VAEC ont été synthétisés.

Un essai immunoenzymatique a été réalisé conformément aux instructions du fabricant (Cambridge Research Biochemicals), en utilisant les sérums provenant de 7 chèvres (dilution 1:100).

5 sérums proviennent de chèvres infectées naturellement avec des souches de VAEC, un sérum provient d'une chèvre infectée expérimentalement avec le VAEC-CO, et un sérum correspond à un pool de 4 sérums provenant de chèvres infectées expérimentalement avec le virus de l'arthrite-encéphalite caprine-CO.

La réaction est détectée par incubation en présence d'Ig de lapin anti-chèvre conjuguées à de la peroxydase (Sigma), diluée au 1:20000 ou en présence d'anticorps monoclonal conjugué à de la peroxydase (Chekit[®]) dilué au 1:200, suivie par une révélation à l'aide de 2,2'-azino-bis(3-éthylbenz-thiazoline-6-acide sulfonique (ABTS, Sigma)).

b) Résultats :

- TM1, TM2 et TM4 :

Il ressort de ces essais que 3 groupes de peptides chevauchants sont réactifs et définissent trois
5 épitopes différents conformément à la figure 2, qui comprend en abscisse les différents fragments chevauchant étudiés et en ordonnée, la densité optique à 405 nm (figure 2A) ainsi que la position des peptides immuno-réactifs sur la séquence (figure 2B).

10 Ces peptides correspondent à TM1, TM2 et TM4.

- TM3 :

De manière surprenante, la région contenant les deux cystéines conservées, connue pour former une structure immunodominante et conservée chez différents
15 lentivirus, ne réagit pas avec les sérums testés, mais le peptide TM3, comprenant cette région, a néanmoins été synthétisé.

Un autre peptide, avec la même séquence, mais chimiquement cyclisé par un lien covalent entre les deux
20 cystéines a également été préparé (TM3c), de manière à reproduire une structure en boucle, considérée comme devant exister dans la protéine TM native.

Un pool de sérums provenant de 30 chèvres est testé en ELISA pour sa réactivité à TM3 et à TM3c.

25 Tous les sérums reconnaissent les deux peptides, il n'existe donc aucune différence significative entre TM3 et TM3c, de telle sorte que les autres expériences ont été réalisées uniquement avec TM3c.

L'épitope TM3 est localisé dans la région env
30 la plus conservée, alors que les séquences correspondant à TM1, TM2 et TM4 présentent des variations (figure 3A).

L'étude comparative et l'alignement des séquences TM immunodominantes avec 3 clones moléculaires MAEDI-VISNA très proches montrent une forte similarité de
35 la région TM3 par rapport à celle de la protéine Env entière (figure 3B).

De plus, il existe une bonne corrélation entre le pourcentage de similarité et la réactivité sérologique des 4 peptides. En fait, la réactivité la plus large du peptide TM3, qui est compris dans la protéine de fusion G5, confirme que cet épitope est localisé dans une région hautement conservée, comme cela est le cas dans les épitopes correspondants, d'autres lentivirus.

TM4 correspond également à une région conservée. Inversement, le domaine G1 qui contient les épitopes TM1 et TM2, semble plus variable.

EXEMPLE 2 : Test de dépistage d'une infection à VAEC.

I - Analyse par immunoblot.

a) Protocole :

Les domaines se liant aux anticorps, à savoir : G1 : 8003-8163, G4 : 8204-8360 et G5 : 8090-8259 ont été exprimés sous forme de protéines de fusion avec la β -galactosidase dans les bactéries *E. coli* lysogéniques Y1089, comme précisé ci-dessus.

Les lysats de bactéries contenant les protéines de fusion ont été préparés à partir de culture lysogénique-HPTG.

Les lysats (40 μ g/puits) sont séparés dans des gels SDS-PAGE (sodium dodécylsulfate-polyacrylamide) à 10 % et transférés sur filtres de nitrocellulose.

Les sites non spécifiques sont bloqués par incubation avec du lait dégraissé à 3 % dans un tampon Tris-HCl (10 mM), NaCl (150 mM) et Tween 20 (0,1 %).

Les bandes de nitrocellulose sont incubées avec un sérum de chèvre dilué au 1:100/1:800 pendant une nuit à 4°C.

La liaison avec l'anticorps est révélée par incubation avec de la protéine G conjuguée à de la peroxydase, diluée au 1:5 000, suivie par une révélation au 4-chlore-1-naphtol (Sigma).

Un lysat de bactéries infectées avec un phage non recombinant λ gt11 est utilisé comme contrôle négatif.

Les sérums collectés avant l'infection expérimentale et un pool de sérums provenant de chèvres non infectées sont utilisés comme contrôle de l'anticorps.

De plus, la co-localisation des bandes immuno-
5 réactives avec les protéines de fusion est vérifiée avec un anticorps monoclonal dirigé contre la β -galactosidase (Promega) ; le western blot sur l'antigène viral purifié est réalisé comme précisé dans R. ZANONI et al., J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 580-582.

10 b) Résultats :

Les peptides G1, G4 et G5 tels que définis à l'exemple 1 couvrant la région immunoréactive de la protéine transmembranaire TM, sont utilisés dans un western blot pour cribler 60 sérums de chèvres infectées naturel-
15 lement provenant de différents troupeaux, dans les conditions ci-dessus.

Le Tableau I ci-après montre que les sérums réagissent avec G5 et G4 à plus de 95 %, alors que seulement 60 % réagissent avec G1.

20 TABLEAU I

RÉSUMÉ DES 60 SÉRUMS TESTÉS			
région TM	G1	G4	G5
sérums positifs	39	57	57
% de sérums positifs	65 %	95 %	95 %

II - Méthode ELISA.

a) Protocole :

25 Les peptides (TM1-TM4) ont été synthétisés et purifiés.

Les peptides TM3 et TM4 ont été adsorbés sur plaque de microtitration comme suit :

100 μ l d'une solution à 5 μ g/ml dans du carbonate de sodium 0,1 M, pH 9,6 ont été adsorbés dans chaque
30 puits de plaque de microtitration (Nunc, Maxisorp®), pendant une nuit à 4°C.

Le peptide TM1 montre une liaison faible et le peptide TM2 ne se lie pas du tout à ces plaques ou à d'autres plaques ELISA testées.

Pour cette raison des plaques qui permettent
5 une liaison covalente de peptides dérivatisés (Nunc Covalink®) ont été utilisées pour TM1 et TM2.

La dérivatisation et l'adsorption de ces peptides sur des plaques sont réalisées comme décrit dans J. SONDERGARD-ANDERSON et al., J. Immunol. Methods, 1990,
10 131, 99-104.

Ces peptides sont solubilisés dans l'eau (TM1 : 1 mg/ml, TM2 : 0,5 mg/ml).

A un volume de solution peptidique, un volume égal de solution aqueuse fraîchement préparée de N-hydroxysuccinimide 0,1 M (NHS, Sigma H-7377) et de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide, HCl (EDC, Sigma E-6383), sont ajoutés.

Après 30 min à température ambiante, les peptides activés sont dilués dans un tampon carbonate 0,1 M
20 glacé (pH 8,9) à 10 µg/ml et 100 µl/puits sont adsorbés par des plaques Covalink® pendant une nuit à 4°C.

Le test ELISA est réalisé comme suit :

après revêtement des plaques de microtitration, ces dernières sont lavées trois fois avec du PBS,
25 les sites d'adsorption résiduelle sur les plaques sont saturés par incubation avec 100 µl de PBS contenant du lait (1 %) et du Tween 20 (0,1 %) (tampon ELISA EB) pendant 2 heures à température ambiante.

Après lavage, 50 µl de sérum de chèvre, dilués
30 au 1:10, dans un tampon EB, sont incubés pendant 2 heures et demi, à température ambiante.

Après lavage 4 fois avec du tampon EB, de la protéine G conjuguée à de la peroxydase (diluée au 1:5 000 dans du PBS Tween 20 0,1 %) est ajoutée pendant
35 2 heures à température ambiante.

Après 5 lavages au PBS, le conjugué à la peroxydase adsorbé est visualisé avec de l'ABTS, 0,2 mg/ml dans de l'acide acétique à 0,6 % pH 4,7 et à une concentration finale p/v de H₂O₂ de 0,01 %.

5 b) Résultats :

La densité optique est mesurée à 405 nm sur des essais réalisés en double. Les résultats sont normalisés en utilisant, comme standard, un ensemble de sérums de chèvre, calibré dans un ELISA Gag-GST, réalisé
10 comme décrit dans R.G. ZANONI et al., J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 1290-1294.

On considère qu'il y a une réaction positive, lorsqu'il y a une réactivité supérieure à 25 % du sérum de référence.

15 190 sérums de chèvres infectées avec le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine, à un stade clinique bien défini, ont été testés selon cette procédure ELISA pour la réactivité avec les 4 épitopes et avec la protéine Gag.

20 Comme illustré au Tableau II ci-après, la plupart des sérums réagissent avec le peptide TM3 et avec la protéine Gag.

TABLEAU II

RÉSUMÉ DES 190 SÉRUMS TESTÉS					
Peptide	TM1	TM2	TM3	TM4	gag
sérums positifs*	122	136	174	145	175
% de sérums positifs*	64 %	72 %	92 %	76 %	93 %
* réactivité supérieure à 25 % du sérum de référence					

Les peptides TM4, TM2 et TM1 réagissent avec la majorité des sérums, quoiqu'avec des pourcentages plus faibles que pour TM3.

30 Quelques sérums, quoique réactifs en western blot avec un culot de virus comme antigènes, sont négatifs en ELISA.

c) Analyse statistique :

Les valeurs de densité optique obtenues en ELISA ont été normalisées et exprimées en tant que pourcentage de réactivité, comparé à un sérum de référence consistant, comme précisé ci-dessus, en un ensemble de sérums séropositifs vis-à-vis du VAEC.

Les réactivités ELISA des sérums d'animaux en bonne santé et d'animaux arthritiques ont été comparées.

Un index de réactivité (IR) est calculé pour chaque sérum testé et correspond à :

$$\text{IR} = \frac{\% \text{ de réactivité aux peptides TM}}{\% \text{ de réactivité à la protéine Gag}}$$

Ces résultats sont illustrés au Tableau III

ci-après :

TABLEAU III

Peptide	GAG		TM1		TM2		TM3		TM4	
	Sain	Malade	Sain	Malade	Sain	Malade	Sain	Malade	Sain	Malade
Statut clinique										
% de réactivité moyenne	268	249	148	189	73	92	147	205	143	317
% de réactivité médiane	179	154	14	80	22	34	77	160	7	125
Index de réactivité	1	1	1,57	2,14	0,67	0,86	1,79	2,51	2,6	3,4

Les sérums de chèvres arthritiques montrent une réactivité élevée avec TM1, TM3 et plus spécifiquement avec TM4, par rapport aux sérums d'animaux en bonne santé (TM1 : $U = 5328,0$, $p = 0,014$; TM3 : $U = 11468,0$,
5 $p = 0,002$; TM4 : $U = 5964,5$, $p < 0,001$).

Par contre, il n'existe aucune différence significative entre les deux groupes d'animaux en ce qui concerne la réactivité des sérums vis-à-vis de Gag et de
10 TM2 (Gag : $U = 4106,0$, $p = 0,391$; TM2 : $U = 4905,5$, $p = 0,198$).

Ces résultats sont illustrés à la figure 4.

La comparaison de la réactivité des sérums de chèvres en bonne santé et arthritiques avec les 4 peptides TM et la protéine Gag a révélé l'existence d'une
15 corrélation entre le développement de l'arthrite virale et la réactivité aux épitopes TM1, TM3 et TM4. Cette corrélation n'a pas été retrouvée pour la réactivité anti-Gag.

La détection de la présence des fragments TM
20 précités (ou des anticorps anti-TM) présente une valeur prédictive, dans le but d'évaluer l'apparition de la maladie clinique et permet de prendre les mesures nécessaires pour une meilleure sauvegarde des troupeaux.

III - Interprétation des résultats obtenus en 25 I et en II.

a) Sensibilité des tests :

- Il existe une certaine différence entre les résultats western blot en ce qui concerne le peptide G4 et les résultats ELISA obtenus avec TM4.

30 - Le western blot se révèle plus sensible pour cet épitope sans doute parce que ce peptide fusionné avec la β -galactosidase présente une conformation qui n'est pas présente dans le peptide libre ou parce qu'il contient plus qu'un épitope.

35 - Environ 35 % des animaux ne réagissent pas avec les épitopes TM1 et TM2 dans les deux tests.

b) Intérêt et propriétés des peptides sélectionnés :

Les résultats obtenus ont permis d'identifier les déterminants impliqués dans la corrélation réactivité
5 sérologique-évolution de l'arthrite virale, et permettent donc un meilleur suivi de cette maladie.

De manière intéressante, l'épitope TM3 de la protéine TM de VAEC a la même localisation que l'épitope immunodominant d'autres lentivirus tels que les lenti-
10 virus entraînant une immunodéficience : HIV, SIV et FIV.

Cet épitope est localisé dans une région contenant une structure définie par deux cystéines qui est conservée par l'ensemble des lentivirus en dépit de l'absence d'une homologie de la séquence primaire.

15 Chez HIV-1, SIV et FIV, la séquence comprise entre les cystéines est hautement conservée entre les différents isolats viraux de la même espèce.

Ceci reflète une pression sélective importante de conservation, probablement dictée par des contraintes
20 structurales.

De manière inattendue, il est apparu que la réactivité de TM3 et TM4 vis-à-vis des anticorps produits lors d'une infection par le VAEC, présente une corrélation significativement élevée avec le développement de la
25 maladie.

Si les régions conservées et immunogéniques de TM ne mutent pas, en raison de contraintes fonctionnelles, l'apparition continuelle de variants env nouveaux entraîne une stimulation permanente du système immuni-
30 taire, qui perpétue et amplifie la production d'anticorps vis-à-vis des épitopes TM constants.

En conséquence, les peptides sélectionnés présentent un intérêt particulier dans le dépistage et l'étude de la réponse humorale à ces épitopes conservés
35 et dans l'étude du suivi et du développement de l'arthrite caprine.

EXEMPLE 3 : Test de dépistage d'une infection à VISNA.

Un essai a été réalisé, pour tester la réactivité des peptides TM3 et TM4 avec des sérums de moutons infectés par le virus VISNA. 40 sérums provenant de moutons d'élevage ont été testés avec les peptides conformes à l'invention (méthode "ELISA peptides") ont été comparés avec le test Chekit® précité.

Les résultats sont résumés dans le Tableau IV suivant :

10

TABLEAU IV

nombre de sérums	10	8	9	12	1
Chekit®	+	+	+	-	-
TM3	+	+	-	-	+
TM4	+	-	-	-	+

Il apparaît que l'ELISA TM3 est plus sensible que l'ELISA TM4. 18 sérums ont été réactifs avec TM3 et avec le test Chekit® et 12 sérums sont négatifs avec les trois tests. 10 sérums ont donné des résultats contradictoires entre le test Chekit® et le test TM3 : 9 sont positifs par le test Chekit® et négatifs avec les peptides, 1 donne des résultats opposés.

6 des sérums positifs avec le test Chekit® et négatifs avec TM3 ont pu être contrôlés par immunoblot : 5 sur 6 ont été négatifs.

Il apparaît donc qu'un nombre important de faux positifs sont détectés avec le test Chekit® et que l'ELISA TM3 conforme à l'invention est significativement plus spécifique. Le seul cas de sérum réactif avec TM3 et TM4 et négatif avec le test Chekit® nécessite des outils supplémentaires pour déterminer s'il s'agit d'un vrai ou d'un faux positif.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en em-

brasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE-CNRS
- (B) RUE: 3 rue Michel Ange
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75794 PARIS

(ii) TITRE DE L' INVENTION: FRAGMENTS D'ACIDE NUCLEIQUE ET
FRAGMENTS

PEPTIDIQUES CORRESPONDANTS ISSUS DU GENOME DU VIRUS DE
L'ARTHRITE ET DE L'ENCEPHALITE CAPRINE (VAEC) ET LEURS
APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 13

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 161 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

```
TAAGGCAGCT GTCCAGACCC TTGCTAATGC AACTGCTGCA CAGCAGGATG TGTTAGAGGC 60
AACCTATGCC ATGGTACAGC ATGTGGCTAA AGGCGTACGA ATCTTGGAAG CTCGAGTGGC 120
TCGAGTGGAA GCTATCACAG ATAGAATAAT GCTATACCAA G 161
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 157 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

```
TACAAAAACA GAAGTAGCAA AATATATCAA TTGGACGAGG TTTAAGGATA ATTGCACATG 60
GCAGCAGTGG GAGAGAGGAT TACAGGGGTA TGATACAAAC TTAACAATAC TGTAAAGGA 120
ATCAGCAGCA ATGACACAAC TAGCAGAAGA GCAAGCA 157
```

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 170 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TAAAGGCGTA CGAATCTTGG AAGCTCGAGT GGCTCGAGTG GAAGCTATCA CAGATAGAAT 60
AATGCTATAC CAAGAATTGG ATTGTTGGCA CTATCATCAA TACTGTATAA CCTCTACAAA 120
AACAGAAGTA GCAAAATATA TCAATTGGAC GAGGTTTAAG GATAATTGCA 170

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GATGTGTTAG AGGCAACCTA TGCCATGGTA CAGCATGTGG CTAAA 45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 36 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GAAGCTATCA CAGATAGAAT AATGCTATAC CAAGAA 36

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 45 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CAAGAATTGG ATTGTTGGCA CTATCATCAA TACTGTATAA CCTCT 45

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 42 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide

- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

TGCACATGGC AGCAGTGGGA GAGAGGATTA CAGGGGTATG AT

42

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Asp	Val	Leu	Glu	Ala	Thr	Tyr	Ala	Met	Val	Gln	His	Val	Ala	Lys
1				5					10					15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 12 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Glu	Ala	Ile	Thr	Asp	Arg	Ile	Met	Leu	Tyr	Gln	Glu
1			5					10			

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Xaa	Glu	Leu	Asp	Cys	Trp	His	Tyr	Xaa	Xaa	Tyr	Cys	Xaa	Thr	Ser
1				5				10						15

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 14 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

Cys Thr Trp Gln Gln Trp Glu Arg Glu Leu Gln Gly Tyr Asp
1 5 10

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "amorce sens"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GGTGGCGACG ACTCCTGGAG CCCG

24

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "amorce anti-sens"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

TTGACACCAG ACCAACTGGT AATG

24

REVENDEICATIONS

1°) Fragments d'acide nucléique, caractérisés en ce qu'ils codent pour un fragment peptidique incluant au moins un segment de protéine Env du VAEC comprenant au moins un épitope immunodominant, sélectionné dans la région transmembranaire de ladite protéine, lesquels fragments d'acide nucléique comprennent entre 15 et 255 nucléotides.

2°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux positions 8003-8163 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence :

TAAGGCAGCTGTCCAGACCCTTGCTAATGCAACTGCTGCACAGCAGGATGTGTTAGAGGCAACCTATGCCATGGTACAGCATGTGGCTAAAGGCGTACGAATCTTGGAAGCTCGAGTGGCTCGAGTGGGAAGCTATCACAGATAGAATAATGCTATACCAAG (SEQ ID n°1), et code pour un fragment peptidique dénommé G1.

3°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux positions 8019-8264 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, et code pour un fragment peptidique dénommé G2.

4°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux positions 7991-8107 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, et code pour un fragment peptidique dénommé G3.

5°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux positions 8204-8360 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence :

TACAAAAACAGAAGTAGCAAAATATATCAATTGGACGAGGTTTAAGGATAATTGCACATGGCAGCAGTGGGAGAGAGGATTACAGGGGTATGATACAACTTAACAATACTGTTAAAGGAATCAGCAGCAATGACACAAC TAGCAGAAGAGCAAGCA (SEQ ID n°2), et code pour un fragment peptidique dénommé G4.

6°) Fragment d'acide nucléique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux positions 8090-8259 du gène codant pour la protéine Env du VAEC, de séquence :

TAAAGGCGTACGAATCTTGAAGCTCGAGTGGCTCGAGTGAAGCTATCACAGATAG
 AATAATGCTATACCAAGAATTGGATTGTTGGCACTATCATCAATACTGTATAACCTC
 TACAAAAACAGAAGTAGCAAAATATATCAATTGGACGAGGTTTAAGGATAATTGCA
 (SEQ ID n°3), et code pour un fragment peptidique dénommé

5 G5.

7°) Fragment d'acide nucléique selon la reven-
 dication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux posi-
 tions 8049-8093 du gène codant pour la protéine Env du
 VAEC, de séquence GATGTGTTAGAGGCAACCTATGCCATGGTACAGC
 10 ATGTGGCTAAA (SEQ ID n°4), et code pour un fragment
 peptidique dénommé TM1.

8°) Fragment d'acide nucléique selon la reven-
 dication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux posi-
 tions 8130-8165 du gène codant pour la protéine Env du
 15 VAEC, de séquence GAAGCTATCACAGATAGAATAATGCTATACCAAGAA
 (SEQ ID n°5) et code pour un fragment peptidique dénommé
 TM2.

9°) Fragment d'acide nucléique selon la reven-
 dication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux posi-
 20 tions 8160-8204 du gène codant pour la protéine Env du
 VAEC, de séquence CAAGAATTGGATTGTTGGCACTATCATCAATACT
 GTATAACCTCT (SEQ ID n°6) et code pour un fragment
 peptidique dénommé TM3.

10°) Fragment d'acide nucléique selon la
 25 revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux
 positions 8256-8297 du gène codant pour la protéine Env
 du VAEC, de séquence TGCACATGGCAGCAGTGGGAGAGAGGATTACAGG
 GGTATGAT (SEQ ID n°7) et code pour un fragment peptidique
 dénommé TM4.

30 11°) Fragment peptidique, caractérisé :

(1) en ce qu'il inclut au moins un segment de
 protéine Env du VAEC, sélectionné dans la région trans-
 membranaire de ladite protéine,

(2) en ce qu'il comprend entre 5 et 85 amino-
 35 acides et au moins un épitope immunodominant, et

(3) en ce qu'il est reconnu par au moins 60 % d'anticorps produits lors d'une infection et/ou lors d'une inoculation par une souche du VAEC.

12°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 53 aminoacides, qui correspond aux positions 665-717 de la protéine Env du VAEC, lequel fragment est dénommé G1.

13°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 82 aminoacides, dénommé G2, qui correspond aux positions 670-751 de ladite protéine Env.

14°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 38 aminoacides, dénommé G3, qui correspond aux positions 661-698 de ladite protéine Env.

15°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 52 aminoacides, dénommé G4, qui correspond aux positions 732-783 de la protéine Env.

16°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 56 aminoacides, dénommé G5, qui correspond aux positions 694-749 de ladite protéine Env.

17°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 15 aminoacides, dénommé TM1, qui correspond aux positions 680-694 de la séquence de la protéine Env du VAEC et dont la formule est :

Asp-Val-Leu-Glu-Ala-Thr-Tyr-Ala-Met-Val-Gln-His-Val-Ala-Lys (SEQ ID n°8).

18°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 12 aminoacides, dénommé TM2, qui correspond aux positions 707-718 de la séquence de la protéine Env du VAEC et dont la formule est :

Glu-Ala-Ile-Thr-Asp-Arg-Ile-Met-Leu-Tyr-Gln-Glu (SEQ ID n°9).

19°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 15 aminoacides, dénommé TM3, qui correspond aux positions 717-731 de ladite protéine Env, lequel segment présente la séquence :

Xaa-Glu-Leu-Asp-Cys-Trp-His-Tyr-Xaa-Xaa-Tyr-Cys-Xaa-Thr-Ser (SEQ ID n°10),

dans laquelle l'acide aminé Xaa en position 1, 9 et 10 représente His ou Gln, l'acide aminé Xaa en position 13 représente Ile ou Val ; de préférence, lorsque l'acide aminé Xaa en position 9 représente His, l'acide aminé Xaa en position 10 et l'acide aminé Xaa en position 1 représentent Gln et l'acide aminé Xaa en position 13 représente Ile et lorsque l'acide aminé Xaa en position 9 représente Gln, l'acide aminé Xaa en position 10 et l'acide aminé Xaa en position 1 représentent His et l'acide aminé Xaa en position 13 représente Val.

20°) Fragment peptidique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il inclut un segment de 14 aminoacides, dénommé TM4, qui correspond aux positions 749-762 de ladite protéine Env, lequel segment présente la séquence :

Cys-Thr-Trp-Gln-Gln-Trp-Glu-Arg-Glu-Leu-Gln-Gly-Tyr-Asp (SEQ ID n°11).

21°) Réactif de dépistage d'une infection à VAEC, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.

22°) Anticorps anti-VAEC, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des anticorps spécifiques d'au moins un fragment peptidique issu de la zone transmembranaire de la protéine Env de VAEC selon l'une quelconque des revendications 11 à 20.

23°) Procédé de dépistage d'une infection à VAEC et/ou à VISNA, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter les anticorps anti-virus, éventuellement présents dans un échantillon biologique, à l'aide d'au moins un peptide ou fragment de peptide selon l'une quelconque

des revendications 11 à 20, éventuellement fixé sur un support solide approprié, en mettant en présence ledit échantillon biologique avec ledit/lesdits peptide(s) ou fragment(s) de peptides, auxquels se lient lesdits anticorps, si de tels anticorps sont présents dans l'échantillon à analyser, la lecture du résultat étant révélée par un moyen approprié, notamment EIA, RIA, fluorescence.

24°) Procédé de dépistage selon la revendication 23, caractérisé en ce que le peptide est choisi parmi TM3 et TM4, ou un mélange de ceux-ci.

25°) Procédé de dépistage d'une infection à VAEC, caractérisé en ce qu'un échantillon biologique convenablement traité pour extraire l'ADN et/ou les produits de transcription du VAEC :

(1) est mis en contact avec au moins un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10,

(2) après quoi, l'hybride formé est détecté.

26°) Procédé de dépistage d'une infection à VAEC selon la revendication 25, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape (1), ledit ADN peut être amplifié.

27°) Procédé de dépistage d'une infection à VAEC, caractérisé en ce qu'il consiste à détecter les glycoprotéines d'enveloppe du VAEC, en mettant en présence un échantillon biologique à tester avec au moins un anticorps anti-peptide selon la revendication 22, la lecture du résultat étant révélée par un moyen approprié.

1/4

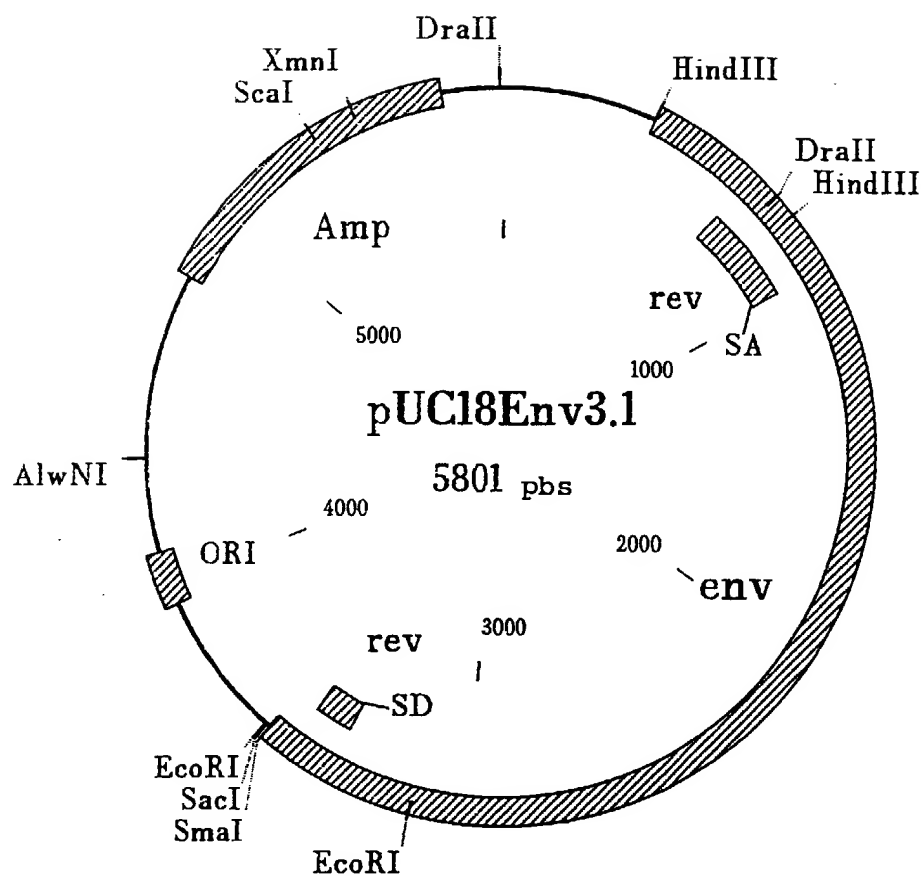


FIGURE 1

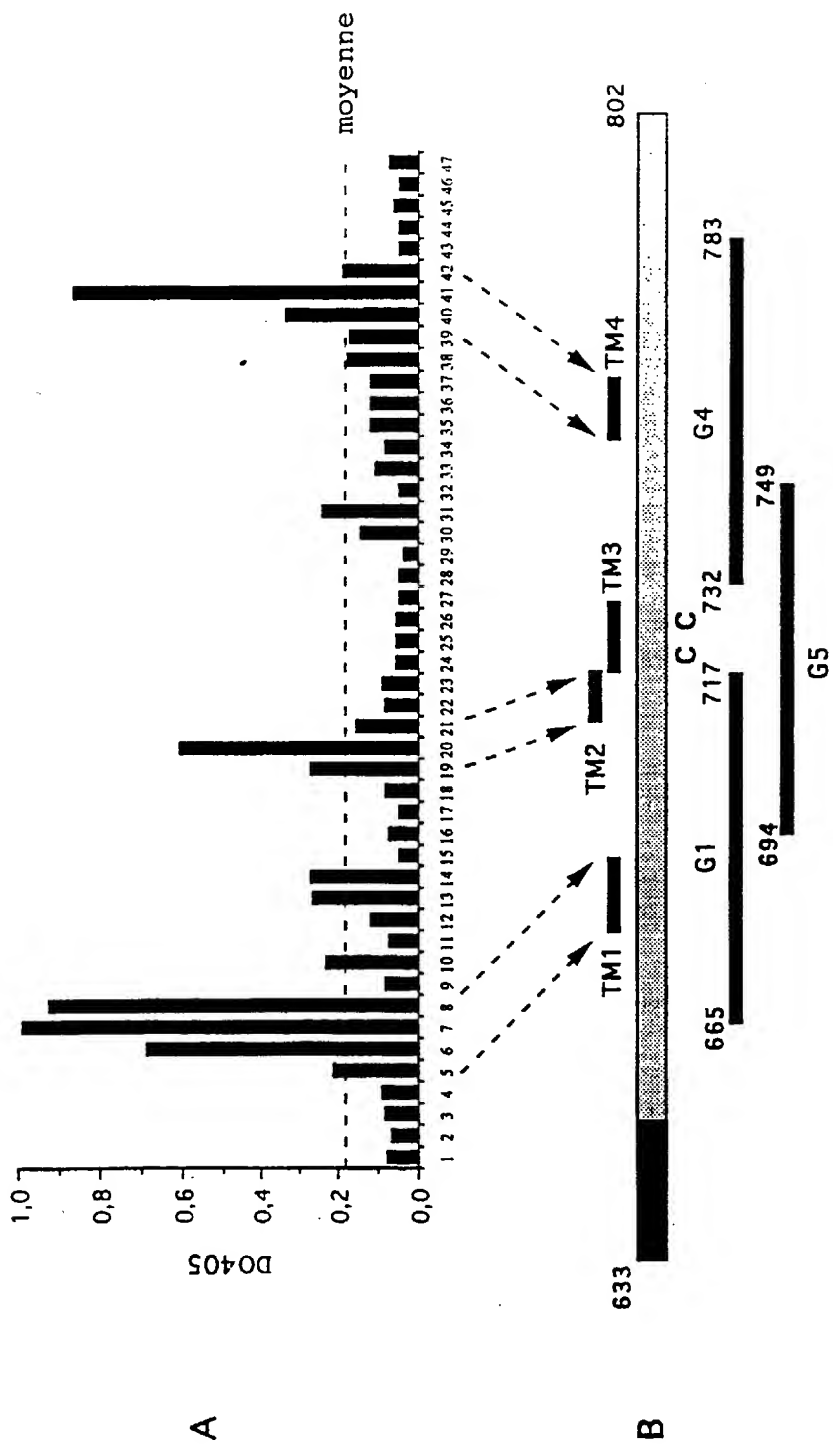


FIGURE 2

3/4

	671					730
CAEV-CO	-----	-----	-----	-----	t--i-----	---hq---
CAEV-63	-----	a-----	-----	-----	t--i-----	---hq---
OMVV-SA	-----	n-----	-----	-----	-----h---	-----
VIS-SON	-----	s-----	-----	-----	l--*--v---	-----
MVV-EV1	-----	n-----	-----	-----	vl--v-----	-----
CONSENSUS	LANATAAQD	VLEATYAMVQ	HVAKGVRILE	ARVARVEAIV	DRMMLYQELD	CWHYQHCVT
		TM1		TM2		TM3

	731					772
CAEV-CO	--kt-----	-----	-----	rglqg y-t--ti--k	--s	
CAEV-63	---a-----	-----	-----	r-lqg y-g--t---	--s	
OMVV-SA	---t--q--	-----	-----	--a-----k	--	
VIS-SON	---s--n--	-----	-----	--g-----	--	
MVV-EV1	--ks-----	-----	-----	--a--q---	--	
CONSENSUS	STR-EVAKYV	NWTRFKDNCT	WQWEEEEIEQ	HE-NLSLLLR	EA	
			TM4			A

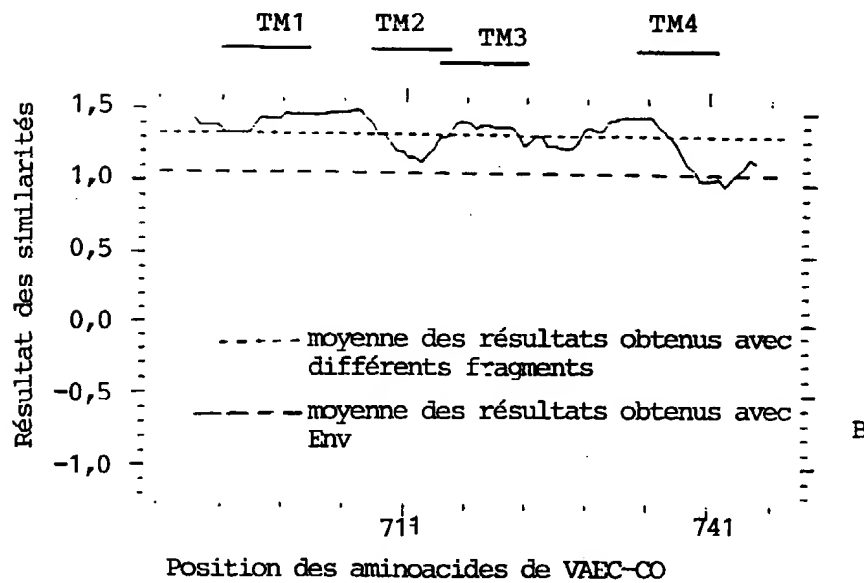
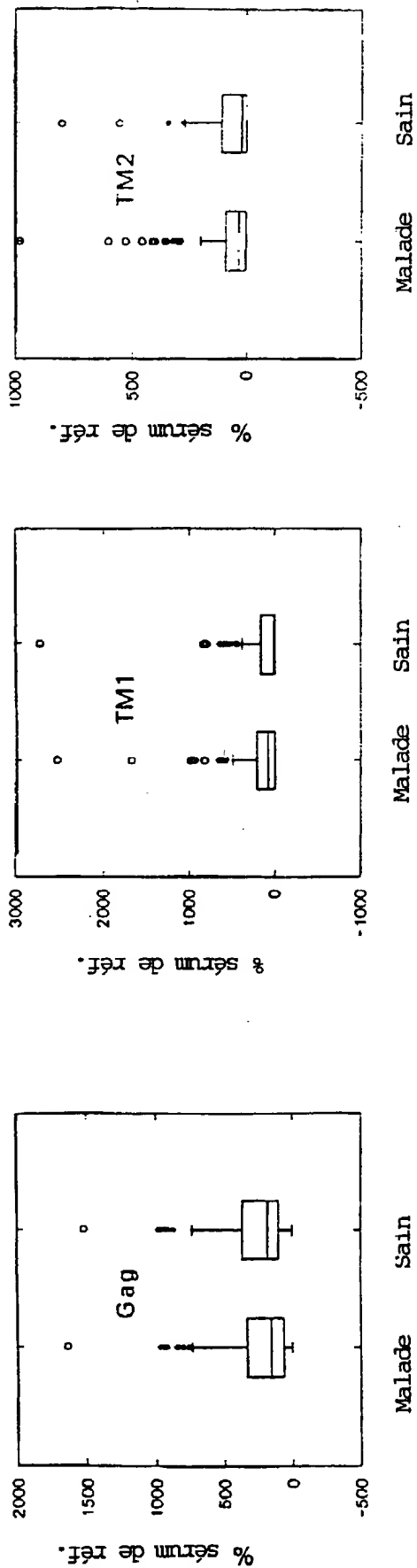


FIGURE 3



4/4

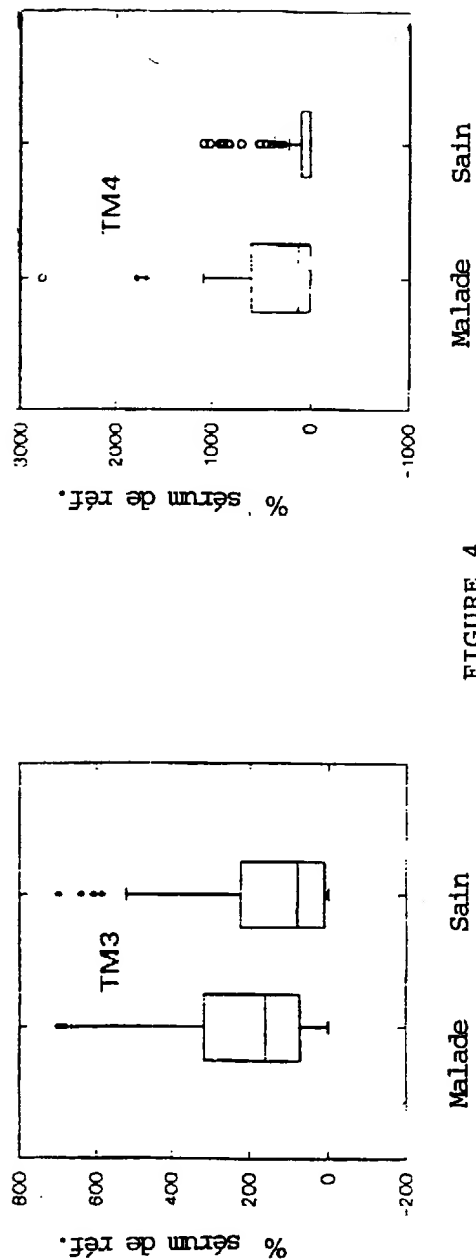


FIGURE 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 95/00848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/49 C07K14/155 C07K16/10 A61K39/21 C12Q1/68
G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N A61K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VIROLOGY, vol. 185, no. 1, November 1991 pages 2-9, C.A. LICHTENSTEIGER ET AL. 'Recombinant gpl35 envelope glycoproteins of caprine arthritis encephalitis lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies' see abstract see page 2, right column, paragraph 2 see page 7, left column, paragraph 2 - page 8, left column, paragraph 2 ----- -/--</p>	1, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 1995

Date of mailing of the international search report

05.10.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 95/00848

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 5, May 1992 pages 3247-3250, TRAVIS MCGUIRE ET AL. 'Transmembrane protein oligomers of caprine arthritis encephalitis lentivirus are immunodominant in goats with progressive arthritis' see abstract see page 3247, left column, paragraph 2 see page 3248, right column, paragraph 2 - page 3249, left column, paragraph 2 ----	1,11
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 65, no. 11, November 1991 pages 5744-5750, D.P. KNOWLES, JR. ET AL. 'Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus' cited in the application see abstract see page 5744, left column, paragraph 2 - right column, paragraph 1 see page 5746, left column, paragraph 4 - right column, paragraph 3 see page 5746, right column, last paragraph - page 5749, left column, paragraph 1 see page 5749, left column, last paragraph ----	1,11
P,X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 11, November 1994 pages 7139-7147, GIUSEPPE BERTONI ET AL. 'Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis ' see abstract see page 7139, right column, paragraph 3 see page 7142, left column, paragraph 4 see page 7142, left column, last paragraph - right column, paragraph 1 -----	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée Internationale No

PCT/FR 95/00848

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/49 C07K14/155 C07K16/10 A61K39/21 C12Q1/68
G01N33/569

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N A61K C12Q G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>VIROLOGY, vol. 185, no. 1, Novembre 1991 pages 2-9, C.A. LICHTENSTEIGER ET AL. 'Recombinant gp135 envelope glycoproteins of caprine arthritis encephalitis lentivirus variants inhibit homologous and heterologous variant-specific neutralizing antibodies' voir abrégé voir page 2, colonne de droite, alinéa 2 voir page 7, colonne de gauche, alinéa 2 - page 8, colonne de gauche, alinéa 2 --- -/--</p>	1, 11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Septembre 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05.10.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. de Internationale No

PCT/FR 95/00848

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 66, no. 5, Mai 1992 pages 3247-3250, TRAVIS MCGUIRE ET AL. 'Transmembrane protein oligomers of caprine arthritis encephalitis lentivirus are immunodominant in goats with progressive arthritis' voir abrégé voir page 3247, colonne de gauche, alinéa 2 voir page 3248, colonne de droite, alinéa 2 - page 3249, colonne de gauche, alinéa 2 ----</p>	1,11
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 65, no. 11, Novembre 1991 pages 5744-5750, D.P. KNOWLES, JR. ET AL. 'Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus' cité dans la demande voir abrégé voir page 5744, colonne de gauche, alinéa 2 - colonne de droite, alinéa 1 voir page 5746, colonne de gauche, alinéa 4 - colonne de droite, alinéa 3 voir page 5746, colonne de droite, dernier alinéa - page 5749, colonne de gauche, alinéa 1 voir page 5749, colonne de gauche, dernier alinéa ----</p>	1,11
P,X	<p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 11, Novembre 1994 pages 7139-7147, GIUSEPPE BERTONI ET AL. 'Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis ' voir abrégé voir page 7139, colonne de droite, alinéa 3 voir page 7142, colonne de gauche, alinéa 4 voir page 7142, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, alinéa 1 -----</p>	1-20